

Indo. J. Chem. Res., 2018, 6(1), 1-5

ISOLASI, IDENTIFIKASI, KARAKTERISASI DAN UJI TOKSISITAS SENYAWA METABOLIT SEKUNDER FRAKSI NONPOLAR AKAR BABANDOTAN *Ageratum conyzoides* L.

Isolation, Identification, Characterization, and Toxicity Essay of Non-Polar Secondary Metabolite Fraction from *Ageratum conyzoides* L

Muhammad Irmawan*, Fredryk W. Mandey, Seniwati Dali

Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Hasanuddin University
Jln. Perintis Kemerdekaan Km.10 Makassar 90245-Indonesia

*Corresponding author, e-mail: muhammadirmawan47@yahoo.com

Received: March 2018 Published: July 2018

ABSTRACT

Ageratum Conyzoides L. has a toxic and bioactive component as anti-cancer and especially for the root, it has anti-tumor. In order to figure out the active component, it is necessary to do four steps; isolation, identification, characterization, and toxicity essay *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) of non-polar fraction *Ageratum conyzoides* L plant. Isolation method consist of four parts; extraction, partitioning of Kupchan method, fractionation, and purification. Fractionation method uses press column chromatography (KTT). Furthermore, purification process uses thin layer chromatography (TLC) and characterization with spectroscopy FTIR, ^1H -NMR and ^{13}C -NMR. Then characterization utilizes spectroscopy FTIR, ^1H -NMR and ^{13}C -NMR. The toxicity essay toward *Artemia Salina* Leach n-hexane fraction and dichloromethane fraction showed that the fraction had toxic properties with number of LC_{50} are 0.0237 and 4.642 $\mu\text{g/mL}$ respectively. Moreover, n-hexane fraction has succeed in isolating Stigmasterol compound shaped white crystalline needles with 19.6 mg weight, 143-144 $^{\circ}\text{C}$ melting point and had toxic properties with number of LC_{50} are 30.33 $\mu\text{g/mL}$.

Keywords: Root of *Ageratum Conyzoides* L., *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT), isolation, stigmasterol

PENDAHULUAN

Ageratum conyzoides L. merupakan tumbuhan yang termasuk dalam genus *Ageratum*, famili Asteraceae, dan dikenal dengan berbagai nama, antara lain: bandotan (Jawa), babandotan (Sunda), dus bedusan (Madura) dan ruku-ruku bembe (Makassar). Tumbuhan *Ageratum conyzoides* L. dikenal sebagai tumbuhan gulma oleh masyarakat, tetapi tumbuhan ini merupakan salah satu tumbuhan herbal yang memiliki sejarah panjang sebagai obat tradisional seperti obat maag, demam, rematik, sakit kepala, sakit perut, diare dan sakit tenggorokan di negara yang beriklim tropis dan sub tropis (Singh dkk., 2013; Tambaru, 2017a). *Ageratum conyzoides* L. juga memiliki kemampuan untuk tumbuh dan menyebar secara cepat, dengan daerah penyebaran ekologi yang luas (Kaur dkk., 2012)

Penelitian terus dilakukan mengenai potensi *Ageratum conyzoides* L. di bidang kesehatan salah satunya yaitu potensinya sebagai obat

antikanker. seperti menguji sifat toksisitas dari senyawa metabolit sekunder dari tumbuhan tersebut, diantaranya, dilakukan oleh Rahim dkk. (2012) yang menunjukkan bahwa ekstrak n-heksana *Ageratum conyzoides* L. bersifat toksik terhadap larva *Artemia salina* Leach dengan LC_{50} sebesar 19,906 $\mu\text{g/mL}$. Nasrin (2013) membuktikan bahwa ekstrak metanol batang *Ageratum conyzoides* L. juga memiliki bioaktivitas yang sangat besar dan bersifat toksik terhadap larva *Artemia salina* Leach dengan nilai LC_{50} sebesar 1,32 $\mu\text{g/mL}$. Sifat toksisitas fraksi atau suatu senyawa memiliki kolerasi terhadap kemampuan suatu bahan obat yang memiliki efek antikanker dalam mematikan suatu unit sel, terkhususnya sel kanker (Carballo dkk, 2002). Hal ini memerlukan pengembangan lebih lanjut dari fraksi atau senyawa untuk menjadi bahan obat antikanker.

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan bahwa tumbuhan *Ageratum conyzoides* L. sangat bersifat toksik dan memiliki potensial sebagai antikanker, oleh karena itu

perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menguji sifat toksisitas dan sifat antikanker dari fraksi nonpolar akar *Ageratum conyzoides* L. Pada penelitian ini telah dilakukan isolasi, identifikasi dan karakterisasi senyawa dalam fraksi yang bertanggungjawab terhadap sifat toksisitas dan sifat antikanker tersebut.

METODOLOGI

Bahan

Sampel yang digunakan pada penelitian ini berupa akar Bantotan *Ageratum conyzoides* L. diperoleh dari pulau Tarakan, Kalimantan Utara. Bahan penelitian lain seperti: metanol teknis, akuades, akuabides, n-heksana p.a, diklorometan p.a, aseton p.a, es batu, plastik wrap, *aluminium foil*, *tissue roll*, kertas saring *Whatman* nomor 42, plat KLT (Merk Kieselgel 60 F254 0,25 mm), silika gel 60 (Merk, no. katalog 7733), silika gel 60 (Merk, no. katalog 7734), telur udang *Artemia salina* Leach, NaCl laut (Sigma, no. katalog S-9883), dan DMSO (Merck, no. katalog 802912).

Alat

Alat-alat yang digunakan antara lain peralatan gelas, corong pisah, statif, klem, botol vial, timbangan digital (Ohaus AP-110), alat evaporasi (BUCHI Rotavapor R-200), botol semprot, alat destilasi, alat kromatografi lapis tipis (KLT) seperti *chamber* dan pipa kapiler, pensil, *cutter*, mistar, inkubator, penangas air, kromatografi kolom tekan (KKT), lampu UV 254-365 nm, sementara untuk analisis spektrofotometer IR dengan varian FTIR Prestige-21 Shimadzu, JEOL JMN A 5000 yang bekerja pada 500,0 MHz untuk spektrum ^1H -NMR dan 125,65 MHz untuk spektrum ^{13}C -NMR.

Prosedur Kerja

Pengolahan dan ekstraksi Akar *Ageratum conyzoides* L.

Ageratum conyzoides L. yang diperoleh dari hasil sampling, selanjutnya dipotong antara akar dan batangnya kemudian dibersihkan dan dikering anginkan. Akar *Ageratum conyzoides* L. yang telah kering, dihaluskan sehingga diperoleh serbuk akar sebanyak 1,9 kg. Selanjutnya dimaserasi dengan metanol beberapa kali selama 4 x 24 jam. Kumpulan maserat yang diperoleh selanjutnya di pekatkan dengan *rotary*

evaporator pada suhu rendah 40–50 °C, maka diperoleh ekstrak metanol (*crude extract*) berwujud semi semi padat berwarna hijau tua.

Fraksinasi dan isolasi fraksi nonpolar akar *Ageratum conyzoides* L.

Ekstrak metanol yang diperoleh selanjutnya difraksinasi dengan metode Kupchan. Fraksinasi dimulai dengan mensuspensikan ekstrak metanol menggunakan air dan dipartisi dengan diklorometan, sehingga diperoleh fraksi air dan fraksi diklorometan. Fraksi diklorometan yang telah pekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu rendah 27 °C, selanjutnya disuspensikan dengan metanol air (9:1) dan dipartisi dengan n-heksana. Fraksi metanol air hasil partisi dan telah di pekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu rendah 37 °C, kemudian disuspensikan dengan metanol air (5:5) dan dipartisi lebih lanjut dengan diklorometan (Kupchan dkk., 1978). Sehingga diperoleh fraksi n-heksana, fraksi diklorometan, fraksi metanol (5:5) dan fraksi air. Pada penelitian kali ini difokuskan pada fraksi non polar yaitu fraksi n-heksan berbentuk semi padat berwarna hijau dan fraksi diklorometan berbentuk semi padat berwarna hitam. Selanjutnya fraksi tersebut dilakukan pengujian toksisitas metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT), Meyer dkk, (1982). Berdasarkan hasil pengujian toksisitas diperoleh fraksi n-heksan bersifat lebih toksik dibandingkan fraksi diklorometan, maka dari itu fraksi n-heksan dilanjutkan keproses isolasi senyawa murni dan pengujian fitokimia. Proses isolasi senyawa melalui tahap fraksinasi dengan (KKT) menggunakan eluen yang sesuai berdasarkan analisis KLT, dimana setiap hasil fraksinasi dimonitor kembali melalui analisis KLT dan tahap pemurnian menggunakan metode kristalisasi dan rekristalisasi, hingga diperoleh senyawa isolat murni.

Uji Toksisitas Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

Penyiapan Larva Udang

Telur udang dimasukkan ke dalam wadah yang berisi air laut untuk ditetaskan. Diaerasi di bawah cahaya lampu pijar 40-60 watt agar suhu penetasan tetap terjaga pada kisaran 25-30 °C. lampu dinyalakan selama 48 jam, setelah telur menetas diambil larva udang yang akan di uji.

Pelaksanaan Uji

Sampel dibuat dalam konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$ lalu ditempatkan dalam 3 vial berbeda. Air laut steril yang mengandung 10 larva udang ditambahkan hingga volume akhir sebanyak 5 mL. di simpan di bawah pencahayaan selama 24 jam. Amati dan hitung jumlah larva yang mati. Persen kematian diperoleh dari rumus (Meyer dkk, 1982).

$$\% \text{ kematian} = \frac{\sum \text{jumlah larva yang mati}}{\sum \text{Larva awal}} \times 100 \%$$

Kemudian ditentukan nilai IC_{50} dengan menggunakan analisis Probit.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi, Fraksinasi dan Isolasi

Serbuk akar *Ageratum conyzoides* L. (1,9 kg) dimaserasi dengan pelarut metanol selama 4 x 24 jam sebanyak 3 kali, dan menghasilkan meserat metanol berwarna hijau, yang selanjutnya dievaporasi untuk menghasilkan ekstrak kental metanol (*crude extract*) semi padat berwarna hijau tua sebanyak 20,6153 g. Selanjutnya, ekstrak metanol difraksinasi menggunakan metode Kupchan dkk, (1978), menghasilkan fraksi utama yaitu, fraksi air, metanol:air (5:5), n-heksan, dan diklorometan.

Namun, pada penelitian kali ini hanya terfokus pada fraksi non polar yaitu fraksi diklorometan berwujud semi padat berwarna coklat kehitaman sebanyak 1,9112 g dan fraksi n-heksan berwujud semi padat berwarna hijau sebanyak 3,1487 g. Fraksi yang diperoleh selanjutnya dilakukan pengujian toksisitas. Uji toksisitas dilakukan bertujuan untuk praskrining efek toksik dari fraksi yang berpotensi dilanjutkan ke proses isolasi senyawa yang diindikasikan memiliki bioaktivitas sebagai antikanker. Menurut Meyer dkk, (1982), efek toksik memiliki kolerasi positif dalam mematikan suatu unit sel, khususnya sel kanker. Suatu fraksi atau senyawa dinyatakan bersifat toksik jika memiliki nilai LC_{50} sebesar $<1000 \mu\text{g/mL}$.

Berdasarkan data nilai toksisitas LC_{50} (Tabel 1) dari fraksi n-heksan dan fraksi diklorometan yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa kedua fraksi tersebut bersifat toksik. Tetapi jika dibandingkan dari kedua fraksi tersebut berdasarkan nilai LC_{50} , fraksi n-heksan bersifat

lebih toksik dari fraksi diklorometan, karena jika semakin kecil konsentrasi suatu fraksi untuk mematikan suatu unit sel, maka fraksi tersebut semakin bersifat toksik, sehingga fraksi n-heksan selanjutnya dilakukan proses isolasi senyawa murni.

Tabel 1. Nilai toksisitas (LC_{50}) fraksi nonpolar akar *Ageratum conyzoides* L.

No.	Fraksi	Nilai toksisitas (LC_{50}) ($\mu\text{g/mL}$)
1	n-heksan	0,0237
2	diklorometan	4,642

Proses isolasi senyawa murni dari fraksi n-heksan dimulai dengan tahap kromatografi kolom tekan (KKT) dengan komposisi pelarut eluen yang tepat digunakan yaitu etil asetat : n-heksan (0,5 : 9,5). Proses pemisahan menggunakan metode kromatografi kolom tekan (KKT) bertujuan untuk memperoleh kelompok senyawa yang sederhana. Pada tahap pemisahan KKT diperoleh 52 sub-fraksi, dari semua sub-fraksi yang didapatkan hanya sub-fraksi 16 yang memiliki potensi untuk dilanjutkan ke proses pemurnian karena memiliki bobot yang besar yaitu sebesar 40,4 mg berbentuk kristal jarum.

Sub-fraksi 16 selanjutnya di KLT dan di rekristalisasi yang bertujuan menghilangkan pengotor yang tercampur. Hasil proses rekristalisasi sub-fraksi 16 diperoleh berbentuk kristal jarum berwarna putih yang teramati berpendar dibawah lampu UV *long wave* (365 nm) dengan bobot sebesar 19,6 mg, dengan titik leleh 143-144 °C dan bereaksi positif dengan pereaksi Liebermann Buchard yang menunjukkan bahwa isolat tersebut merupakan senyawa golongan steroid.

Karakterisasi dengan metode spektroskopi

Analisis spektroskopi FTIR senyawa isolat memperlihatkan pita serapan gugus hidroksil (-OH) yang khas pada daerah 3433,41 cm^{-1} . bilangan Kemudian serapan bilangan gelombang 2934,79 cm^{-1} dan 2863,42 cm^{-1} menunjukkan gugus $-\text{CH}_2\text{sp}^3$, didukung pita serapan daerah 1376,26 cm^{-1} menunjukkan gugus $-\text{CH}_3$ dan sinyal 1462,09 cm^{-1} menunjukkan gugus $-\text{CH}_2$. Selanjutnya bilangan gelombang 1645,33 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus alkena (C=C) dan pada serapan bilangan gelombang

1055,10 cm^{-1} dan 877,6 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus sikloalkana.

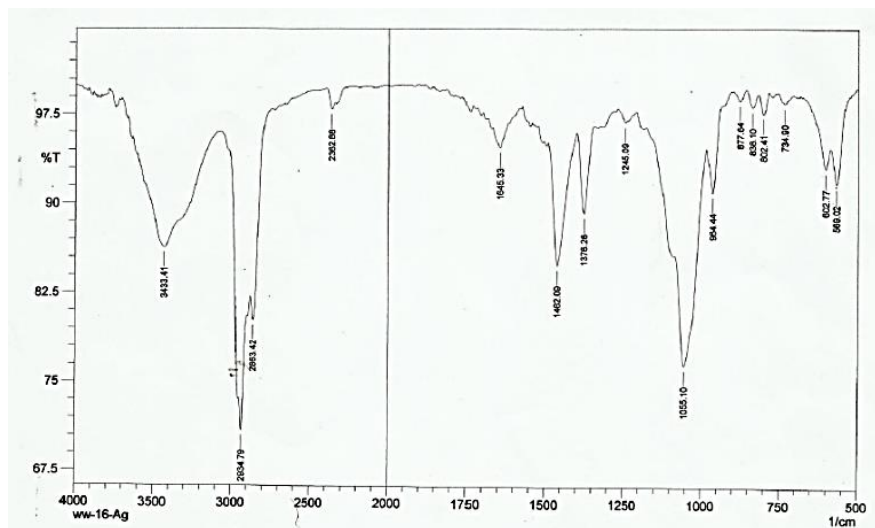
Analisis data spektrum ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) senyawa isolat memperlihatkan beberapa sinyal karbon. Adapun geseran kimia, δ_{C} (ppm) sinyal-sinyal karbon senyawa isolat. Geseran kimia khas yang terdapat pada senyawa A terdiri atas 1 sinyal C sp^3 gugus turunan yang mengikat O yaitu oksikarbon (C-O) ditunjukkan pada pergeseran kimia δ 71,8 (C-3). Sinyal dengan pergeseran kimia antara 90-160 ppm menunjukkan gugus alkena yaitu pada sinyal δ 140,7 (C-5), δ 121,7 (C-6), δ 138,3 (C-22) dan δ 129,2 (C-23). Selanjutnya nilai geseran kimia antara 10-50 ppm yaitu δ 12,2 (C-18) dan δ 18,9 (C-19) menunjukkan C sp^3 alkil yang tidak mengikat O.

metil yang juga terdapat pada senyawa yaitu δ 1,02 (9H, s, H18), δ 0,70 (6H, d, $J = 9,2$ Hz, H19) dan δ 0,93 (3H, d, $J = 6,7$ Hz, H21) ppm.

Berdasarkan hasil analisis ^{13}C NMR dan ^1H NMR yang diperkuat dengan data spektroskopi FTIR, uji golongan dan uji titik leleh maka dapat disimpulkan bahwa senyawa isolat yang telah berhasil diisolasi dan diidentifikasi dari *Ageratum conyzoides* L. fraksi n-heksan adalah senyawa stigmasterol.

Pengujian Toksisitas dan bioaktivitas antikanker

Senyawa stigmasterol yang berhasil diisolasi dari fraksi n-heksan tumbuhan akar *Ageratum conyzoides* L. selanjutnya dilakukan pengujian toksisitas terhadap *Artemia salina*



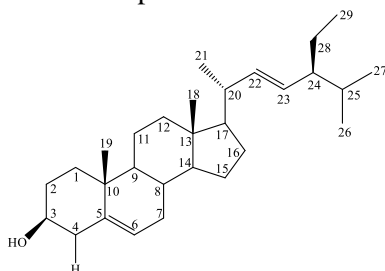
Gambar 1. Hasil identifikasi spektrofotometer FTIR senyawa isolat

Analisis data spektrum ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) senyawa isolat memperlihatkan beberapa sinyal khas. Adapun geseran kimia, δ_{C} (ppm) sinyal khas ^1H NMR senyawa isolat, dimana beberapa sinyal khas ^1H NMR pada senyawa isolat diantaranya terdapat 1 sinyal proton δ 5,36 (2H, d, $J = 5,1$ Hz, H6) yang mengindikasikan sinyal proton yang terikat pada gugus olefin kuarterner (C=C). Kemudian sinyal δ 5,03 (1H, dd, $J = 15,1$ 8,5 Hz, H22) dan δ 5,16 (1H, dd, $J = 15,1$, H23) ppm yang mengindikasikan 2 proton yang terikat pada sistem olefin (C=C) pada posisi geometri trans. Sinyal δ 3,53 (2H, tt, $J = 10,4$, 4,6 Hz, H3) menunjukkan adanya proton yang terikat pada gugus oksikarbon (-OCH). Selanjutnya sinyal berada pada posisi antara 0,7-1,0 ppm menunjukkan adanya gugus

Leach. Berdasarkan hasil pengujian toksisitas diperoleh LC_{50} senyawa stigmasterol yaitu sebesar 30,33 $\mu\text{g/mL}$. Menurut Meyer, 1982 suatu senyawa murni dinyatakan toksik jika nilai $\text{LC}_{50} < 200$ $\mu\text{g/mL}$. Maka dapat disimpulkan bahwa senyawa stigmasterol yang berhasil diisolasi memiliki sifat toksik yang berpotensi dikembangkan sebagai senyawa antikanker, untuk mengetahui sifat antikanker dari senyawa stigmasterol maka lakukan pengujian biokativitas antikanker metode MTT terhadap sel kanker jenis sel murin Leukemia P-388.

Hasil pengujian bioaktivitas antikanker senyawa stigmasterol dengan menggunakan metode MTT, diperoleh nilai IC_{50} senyawa stigmasterol yaitu sebesar 184,80 $\mu\text{g/mL}$. Hasil data IC_{50} senyawa stigmasterol menunjukkan

bahwa senyawa tersebut tidak memiliki bioaktivitas terhadap sel leukemia P-388.



Gambar 2. Stigmasterol

Menurut Suffness dan Pezzuto (1990), suatu senyawa murni dinyatakan memiliki bioaktivitas antikanker terhadap sel leukemia P-388 jika memiliki nilai IC_{50} sebesar $<4 \mu\text{g/mL}$. Sehingga dapat disimpulkan senyawa stigmasterol yang berhasil di isolasi tidak memiliki bioaktivitas sebagai antikanker terhadap sel kanker leukemia P-388.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian terhadap fraksi nonpolar n-heksan dan diklorometan akar tumbuhan *Ageratum conyzoides* L. pada pengujian toksisitas terhadap *Artemia salina* Leach diperoleh fraksi tersebut bersifat toksik dengan nilai LC_{50} berturut-turut sebesar 0,0237 dan 4,642 $\mu\text{g/mL}$, selanjutnya dari fraksi n-heksan berhasil diisolasi senyawa stigmasterol golongan steroid berbentuk kristal jarum putih dengan bobot sebesar 19,6 mg, titik leleh 143-144 °C dan bersifat toksik terhadap *Artemia salina* Leach dengan nilai LC_{50} sebesar 30,33 $\mu\text{g/mL}$ tetapi tidak memiliki aktivitas sebagai antikanker terhadap sel murin leukemia P-388.

DAFTAR PUSTAKA

Carballo, J.L., Hernandez-Inda, Z.L., Perez, P., Garcia-Gravalos, M.D., 2002, A Comparison Between Two Brine Shrimp Assays to Detect in Vitro Cytotoxicity in Marine Natural Products, *BMC Biotech-nology*, 2(17), 1-5.

Kaur, S., Batish, D. R., Kohli, R. K., Singh, H. P., 2012, *Ageratum conyzoides: an Alien Invasive Weed in India*, CAB International, 57-76.

Kupchan, S. M., Stevens, K. L., Rohlfing, E. A., Sickless, B. R., Sneden, A. T., 1978, New Cytotoxic Neolignans From *Aniba megaphyllia* Mez., *J. Org. Chem*, 43(4):586-590.

Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols, D. E., dan McLaughlin, J. L., Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay For Active Plant Constituents, *Journal Of Medicinal Plant Research*, 45:33-34.

Nasrin, F., 2013, Antioxidant and Citotoxic Activities Of *Ageratum conyzoids* Stems, *International Current Pharmaceutical Journal*, 2(2):33-37.

Rahim, A., Gemini, A., Agustina, R., Rusydi, M., 2012, Skrining Toksisitas Ekstrak Herba Bandotan (*Ageratum conyzoides* L) dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test, *Majalah Farmasi dan Farmakologi*, 16(2):99-106.

Singh, S. B., Devi, W. R., Marina, A., Devi, I., Swapana, N., Sing, C. B., 2013, Ethnobotany, Phytochemistry and Pharmacology Of *Ageratum conyzoides* Linn (Asteraceae), *Journal Of Medicinal Plants Research*, 7(8):371-385.

Suffness, M., Pezzuto, J. M., 1990, *Assays Related to Cancer Drug Discovery Hostettmann K(Ed). Mtoide In Plant Biochemistry. Assays for Bioactivity*, London.

Tambaru, E., 2017a, Keragaman Jenis Tumbuhan Obat Indigenous di Sulawesi Selatan, *Jurnal Ilmu Alam dan Lingkungan*, 8(15), 7-13.